



Universitat Autònoma
de Barcelona
Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia
Unitat de Farmacologia, Facultat de Medicina

**Caracterització de les activitats anticolinesteràsica,
antiagregant i neuroprotectora dels compostos duals
heterodímers Hup7TH i Hup7TCI**

MEMÒRIA DEL TREBALL EXPERIMENTAL PER A L'OBTENCIÓ
DE 12 CRÈDITS DEL PROGRAMA DE DOCTORAT DE
FARMACOLOGIA

Júlia Relat Pardo

Bellaterra, Maig 2010



Universitat Autònoma
de Barcelona

Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia
Unitat de Farmacologia, Facultat de medicina

Caracterització de les activitats anticolinesteràsica, antiagregant i neuroprotectora dels compostos duals heterodímers Hup7TH i Hup7TCI

Memòria del treball experimental, presentat per **Júlia Relat Pardo**, per a l'obtenció de 12 crèdits del Programa de Doctorat de Farmacologia, realitzat sota la direcció de la **Dra. M. Victòria Clos Guillén**, professora titular del Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia de la Facultat de Medicina de la UAB.

Dra. M. Victòria Clos Guillén

Bellaterra, Maig 2010

ÍNDEX

ÍNDEX

I.	ABREVIATURAS	1
II.	RESUM	2
III.	INTRODUCCIÓ	
1.	GENERALITATS DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER.....	3
2.	APROXIMACIONS TERAPÈUTIQUES ACTUALS I NOVES PROPOSTES.....	5
2.1	Inhibidors de l'AcHe (IACHe).....	5
2.2	Agonistes dels receptors colinèrgics.....	8
2.3	Memantina.....	9
2.4	Modificadors de la malaltia d'Alzheimer.....	9
3.	NOVES ESTRATÈGIES AMB ELS IACHe: HUPRINES HETERODÍMERS.....	10
3.1	Huprines.....	10
3.2	Heterodímers huprina Y-tacrina.....	11
IV.	OBJECTIUS	13
V.	MATERIAL I MÈTODES	
1.	MATERIAL.....	14
2.	MÈTODES	
2.1	Determinació de l'activitat anticolinesteràsica <i>in vitro</i> dels heterodímers Hup7TCl i Hup7TH.....	15

2.2	Estudi de l'efecte dels heterodímers Hup7TCI i Hup7TH en l'agregació amiloidegènica del pèptid PrP106-126 induïda per l'AChE.....	16
2.2.1	Microscòpia de fluorescència i anàlisi d'imatges.....	17
2.3	Estudis de toxicitat i neuroprotecció amb els heterodímers Hup7TCI i Hup7TH en cèl·lules SH-SY5Y	
2.3.1	Cultiu cel·lular.....	17
2.3.2	Estudis de toxicitat. Inducció de l'apoptosis i tractament farmacològic.....	18
2.3.3	Assaig de determinació de la viabilitat cel·lular.....	19
3.	ÀNALISI ESTADÍSTICA.....	19
VI.	RESULTATS	
1.	DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT ANTICOLINESTERÀSICA <i>IN VITRO</i> DELS HETERODÍMERS HUP7TCI I HUP7TH.....	20
2.	ESTUDI DE L'EFECTE DELS HETERODÍMERS HUP7TCI I HUP7TH EN L'AGREGACIÓ AMILOIDOGÈNICA DEL PÈPTID PrP106-126 INDUÏDA PER L'AChE.....	23
3.	ESTUDIS DE TOXICITAT I NEUROPROTECCIÓ DELS HETERODÍMERS HUP7TCI I HUP7TH EN CÈL·LULES SH-SY5Y.....	23
VII.	DISCUSSIÓ	28
VIII.	CONCLUSIONS	32
IX.	BIBLIOGRAFIA	33

I. ABREVIATURES

I. ABREVIATURES

A β : pèptid β -amiloide

ACh: acetilcolina

AChE: acetilcolinesterasa

AChEb: acetilcolinesterasa bovina

AChEhr: acetilcolinesterasa humana recombinant

APP: proteïna precursora de l'amiloide

ASCh: acetiltiocolina

BACE: β -secretasa

BCh: butirilcolina

BChE: butirilcolinesterasa

BChEh: butirilcolinesterasa humana

BSCCh: butiriltiocolina

Chat: colin-acetiltransferasa

ChE: colinesterasa

IC₅₀: concentració inhibidora 50

DTNB: àcid 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoic)

EEM: error estàndard de la mitjana

IACHe: inhibidors de l'acetilcolinesterasa

MA: malaltia d'Alzheimer

MAPK: proteïna quinasa mitogen activada

MMA: mida màxima dels agregats

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazoli bromur

NMDA: àcid-N-metil-D-aspartic

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa

PKC: proteïna quinasa C

PrP: proteïna priònica

ROS: espècies de l'oxigen reactives

SNC: sistema nerviós central

(\pm),(-),(+): racèmic, levògir, dextrògir

II. RESUM

II. RESUM

La malaltia d'Alzheimer és una de les malalties neurodegeneratives de major rellevància i importància social, essent els inhibidors de l'acetilcolinesterasa (AChE) els fàrmacs d'elecció pel seu tractament. Tot i així, l'eficàcia parcial d'aquestes teràpies ha fet que, actualment, la recerca de nous AChE no es basi només en la seva capacitat anticolinesteràsica, sinó també en altres aspectes no canònics d'aquests fàrmacs, com la capacitat per bloquejar el lloc perifèric de l'AChE que intervé en l'agregació del pèptid β -amiloide, o l'efecte neuroprotector. En aquest sentit, en el present treball, s'ha determinat l'activitat anticolinesteràsica d'una nova família d'AChE de lloc d'unió dual, els heterodímers Hup7TCl i Hup7TH, productes de la dimerització de la huprina Y i la tacrina, així com el seu efecte antiagregant davant del procés amiloidogènic del pèptid PrP106-126 induït per l'AChE, i els seus possibles efectes neuroprotectors en cultius cel·lulars.

S'han determinat les IC_{50} de les formes racèmiques, dextrògires i levògires dels heterodímers Hup7TCl i Hup7TH per l'AChE_{hr} (AChE humana recombinant) i la BChE_h (BChE humana), mostrant totes elles una alta afinitat pels dos enzims. Paral·lelament, s'ha estudiat l'efecte d'aquests compostos en l'agregació amiloidogènica de la PrP106-126 induïda per l'AChE_b (AChE bovina), i tots ells han inhibit de forma significativa aquest procés. Finalment, s'han realitzat experiments de neuroprotecció amb els mateixos fàrmacs davant de privació sèrica en cèl·lules SH-SY5Y, obtenint-se tan sols un lleuger augment de la viabilitat cel·lular en el cas del compost racèmic (\pm)Hup7TCl.

III. INTRODUCCIÓ

III. INTRODUCCIÓ

1. GENERALITATS DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER

La malaltia d'Alzheimer (MA) és un desordre neurodegeneratiu del sistema nerviós central (SNC), el qual representa la forma més comú de demència en les persones d'edat avançada, constituint el 50-60% de tots els casos de demència entre les persones de majors de 65 anys (1). Les estadístiques mostren que el nombre de pacients de 65 anys és només del 10%, mentre que els de més de 85 anys ja arriben al 50% (2). Degut a l'augment de l'esperança de vida en els països industrialitzats s'estima que en els pròxims 50 anys el nombre de pacients amb MA es triplicarà. Aquestes dades són importants en tant que la malaltia causa la pèrdua progressiva de la memòria i l'alteració del comportament, la qual cosa provoca incapacitat funcional i dependència.

Tot i el progrés assolit en les dues últimes dècades, el mecanisme patològic de la MA encara no està clar. Des del punt de vista molecular, la malaltia es caracteritza per dues alteracions principals: les plaques neurítiques, dipòsits extracel·lulars de fibril·les i agregats del **pèptid β -amiloide** ($A\beta$) (3) i els cabdells neurofibril·lars, que són agregats intracel·lulars de **la proteïna tau hiperfosforilada** (4). Aquestes alteracions estan presents principalment en les zones del cervell associades a l'aprenentatge, la memòria i el comportament emotiu com l'hipocamp i les regions associatives del còrtex cerebral.

El pèptid β -amiloide deriva de la proteïna de trans-membrana precursora amiloide (APP). Aquesta pateix com a mínim tres trencaments en tres llocs diferents, deguts a l'acció de les secretasses α , β i γ (5). En la via majoritària de processament d'aquesta proteïna l'escissió per part de la secretasa α (TACE/ADAM17, ADAM10) dona lloc a la formació de l'APP α , que és secretada, i el fragment c-terminal (C83), que es manté associat a la cèl·lula i que posteriorment serà trencat per la secretasa γ . L'APP α és un pèptid neurotròfic i neuroprotector. Respecte a la via alternativa, la secretasa β (BACE1) talla l'APP alliberant la forma secretada APP β i el fragment c-terminal

(C99). Aquest, és trencat per la secretasa γ donant lloc al pèptid $A\beta$, que majoritàriament s'allibera a l'espai extracel·lular. Quan es perd l'equilibri entre les dues vies i hi ha una sobreproducció d' $A\beta$, la via alternativa es converteix en prioritària i per tant, en patològica (Fig.1).

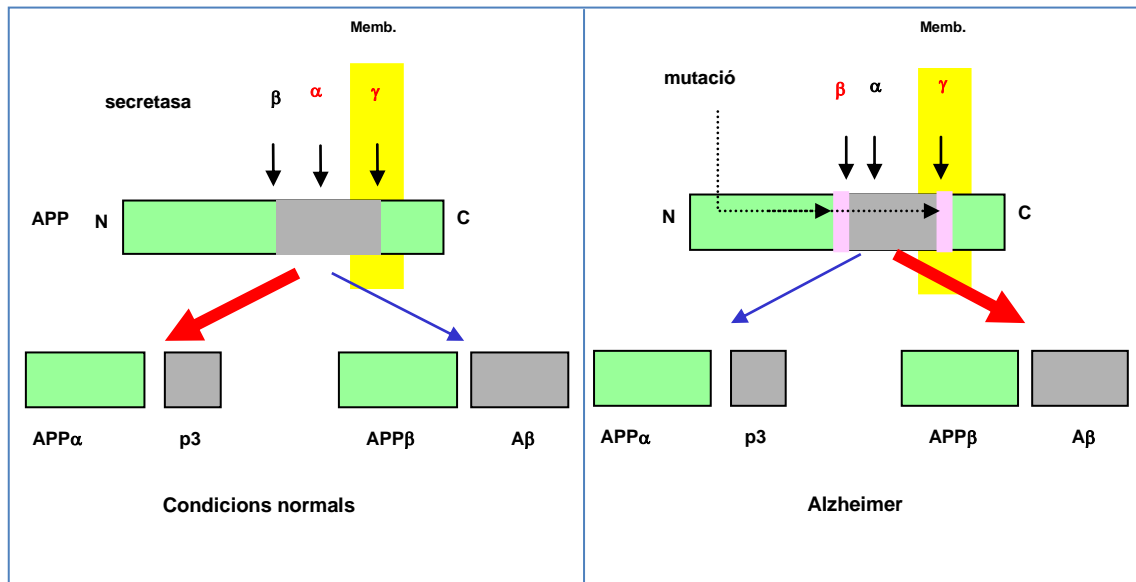


Fig.1 Processament de l'APP en condicions normals i en malalts d'Alzheimer.

L' $A\beta$ conté entre 40 i 42 aminoàcids. Principalment, es secreta la forma $A\beta_{1-40}$, i només el 10-15% és $A\beta_{1-42}$, que és l'espècie més tòxica. Cal tenir en compte que el pèptid $A\beta$ s'agrega formant oligòmers insolubles que s'acumulen al cervell donant lloc a les plaques neurítiques. La interacció d' $A\beta$ amb la mitocondria, així com amb les membranes cel·lulars, o per activació de les cèl·lules glials, dispara la cascada neurotòxica generant estrès oxidatiu (radicals lliures d'oxigen i de nitrogen amb els seus mecanismes desencadenants) i dany inflamatori. Aquesta cadena d'esdeveniments porta a la mort neuronal ja sigui per necrosis o per apoptosis.

La "hipòtesis de la cascada amiloidogènica" postula que la generació d' $A\beta$, així com la seva agregació i posterior acumulació en dipòsits extracel·lulars, és la principal causa de la MA (6). Segons aquesta teoria, el bloqueig de la formació

d'A β i/o la seva disposició en plaques podria prevenir la progressió de la MA (7).

Pel que fa a la proteïna tau, aquesta s'expressa associada als microtúbuls dels axons; els estabilitza facilitant així el transport axonal (8). En la MA, aquesta proteïna es troba hiperfosforilada i agregada en filaments helicoïdals aparellats formant els cabdells neurofibril·lars (9). La hiperfosforilació de les proteïnes tau, per tant, provoca la disfunció del transport neuronal i el posterior trencament del sistema. La formació de cabdells neurofibril·lars contribueix a l'aparició de la MA. Tot i que encara no està clar que apareix abans, si els cabdells neurofibril·lars o les plaques neurítiques.

Tot això comporta, tal i com van descriure Davies i Maloney el 1976 (10), una pèrdua de neurones colinèrgiques amb una **hipofunció colinèrgica** associada, que es carectaritza per una disminució de la síntesis d'acetilcolina (ACh) degut a la disminució dels nivells de colin-acetiltransferasa (ChAT) i de colina. A més, també es redueix significativament el número de receptors nicotínics i muscarínics pre-sinàptics (11). La "hipòtesis colinèrgica" suggereix que la hipofunció colinèrgica a nivell central contribueix a l'aparició de la majoria dels dèficits cognitius i de comportament en els pacients amb MA (12).

2. APROXIMACIONS TERAPÈUTIQUES ACTUALS I NOVES PROPOSTES

Actualment, els únics fàrmacs aprovats pel tractament de la MA per la Food and Drug Administration (FDA) (Fig.2), així com per l'agència europea i espanyola del medicament (EMA i AEM), són els inhibidors de l'AChE i la memantina, un antagonista dels receptors N-metil-D-aspartat (NMDA), tot i que altres aproximacions terapèutiques estan en estudis clínics avançats.

2.1 Inhibidors de l'AChE (IACHÉ)

Els IACHÉ actuen inhibint l'enzim responsable de la hidròlisi de l'ACh. L'ACh roman a la juntura sinàptica durant més temps i per tant, augmenta la seva

disponibilitat. Són els fàrmacs d'elecció pel tractament de la MA i altres formes de demència relacionades (13).

Els quatre IChE comercialitzats són: la tacrina o tetrahidroacridina (THA) (1993), el donepezil, derivat piperidínic (1996), la rivastigmina, un carbamat (2000) i la galantamina, un alcaloide d'origen natural (2001) (Fig.2). Són inhibidors reversibles i competitius, només la rivastigmina s'uneix de forma pseudoirreversible al lloc esteàric del lloc actiu de l'ACHe. El donepezil i la galantamina són selectius per l'ACHe i en canvi la rivastigmina i la tacrina inhibeixen tant l'ACHe com la butirilcolinesterasa (BChE). Tots ells i pel que fa als efectes secundaris, presenten nàusees, vòmits, diarrea i anorèxia (efectes colinèrgics). La tacrina també provoca hepatotoxicitat i en conseqüència rarament es prescriu (13).

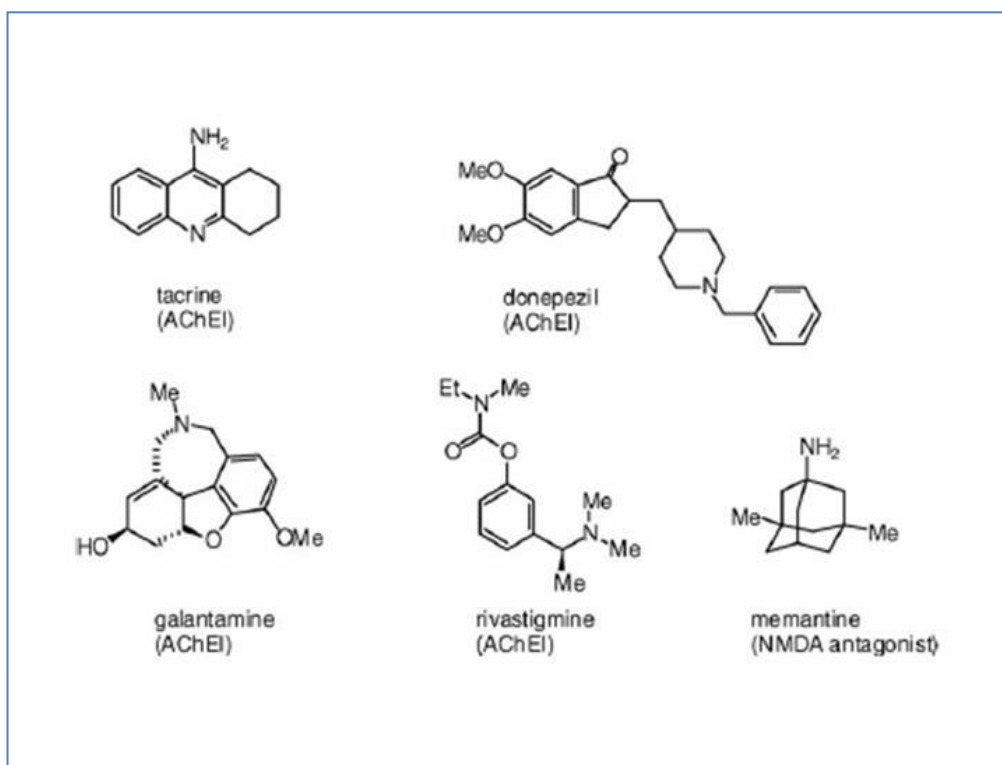


Fig.2 Estructura dels fàrmacs actualment aprovats per la FDA pel tractament de la MA.

Estudis pre-clínic mostren que els quatre IChE comercialitzats, i particularment el donepezil, presenten efectes neuroprotectors *in vitro* i *in vivo*. Diferents mecanismes han estat proposats per explicar els efectes

neuroprotectors d'aquests fàrmacs, tots ells independents de la inhibició de la hidròlisi de l'ACh. Bloqueigen l'excitotoxicitat induïda pel glutamat al ser antagonistes dels receptors NMDA (14), mobilitzen el Ca^{2+} intracel·lular del reticle endoplasmàtic activant els receptors σ_1 (15) i/o regulen a l'alça la variant neuroprotectora de l'AChE, l'AChE-R o forma retro (16).

Altres mecanismes posen de manifest la relació entre el sistema colinèrgic i el metabolisme de l'APP. L'activació indirecta dels receptors muscarínics i nicotínics per part dels IChE sembla tenir el mateix efecte que l'activació per agonistes directes explicada més endavant. Així, estudis *in vitro* demostren l'increment dels nivells de l'APP α induïts per la tacrina i el donepezil via proteïna kinasa C (PKC) (17). Altres estudis mostren que indueixen la sobreexpressió de la proteïna antiapoptòtica bcl-2 al estimular els receptors nicotínics subtipus $\alpha 7$ i $\alpha 4\beta 2$ (18). Cal afegir que la galantamina, a més, també és un activador al·lostèric dels receptors nicotínics subtipus $\alpha 4\beta 2$.

Per altra banda, se sap que l'AChE a més de la seva capacitat d'hidrolitzar l'ACh, també és capaç de promoure l'agregació amiloidogènica tant de la proteïna A β com de la proteïna priònica (19,20). Els experiments fets per Inestrosa i cols. (21) demostren que l'AChE pot unir-se al pèptid A β , induir-li un canvi conformacional cap a la forma amiloidogènica, i accelerar-ne el seu procés d'agregació i formació de fibril·les amiloides. Diferents estudis tant *in vitro* (22) com *in vivo* (23) mostren que l'AChE forma complexes estables amb el pèptid A β , i no només n'accelera la seva agregació i la formació de plaques amiloides, sinó que també n'augmenta la seva neurotoxicitat. Aquest efecte amiloidogènic de l'AChE descrit per l'A β , ha estat també demostrat per les proteïnes amiloidogèniques PrP106-126 i PrP82-146 (19,20).

D'acord amb l'estructura de l'AChE se sap que el lloc catalític de l'enzim es troba al final d'una gorja, mentre que la capacitat per induir l'agregació amiloidogènica es troba al lloc anomenat perifèric tal com indica la figura 3. L'agregació amiloidogènica induïda per l'AChE és inhibida per substàncies específiques per aquest lloc tals com el iodur de propidi (24).

Dels quatre IChE comercialitzats tan sols el donepezil és capaç d'inhibir l'agregació de la proteïna A β induïda per l'ACHÉ.

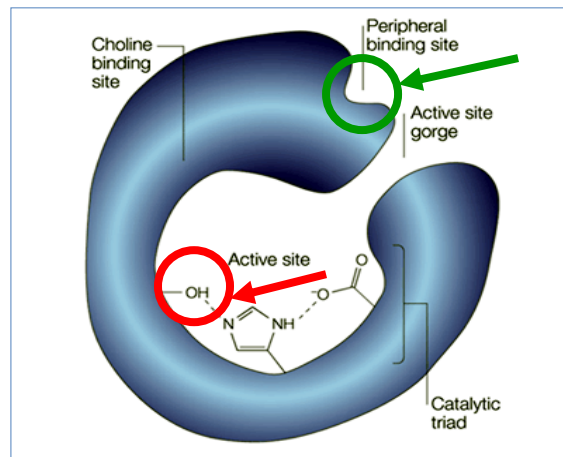


Fig.3 Estructura de l'ACHÉ on s'observa el lloc catalític (vermell) i el lloc perifèric (verd).

2.2 Agonistes dels receptors colinèrgics

Considerant la MA com una hipofunció colinèrgica, s'han buscat possibles molècules que actuïn a nivell dels receptors muscarínics M1 i M3 o bé dels nicotínics subtipus $\alpha 3$, $\alpha 4\beta 2$ i $\alpha 7$, ja que a tots ells se'ls ha relacionat amb processos cognitius i neuroprotectors. Així doncs, els receptors M1 i M3, a part de presentar un paper important en les funcions de memòria i aprenentatge, faciliten la secreció de l'APP α via PKC, tirosin-kinasa i proteïna kinasa mitogen-activada (MAPK) (25,26) (Fig.4). També s'ha observat que, els subtipus de receptors nicotínics $\alpha 3$, $\alpha 4\beta 2$ i $\alpha 7$ també faciliten el processament de l'APP via secretasa α (Fig.4), i a més, sembla que inhibeixen l'agregació d'A β (27). Altres estudis mostren, com ja s'ha comentat, que l'estimulació dels subtipus $\alpha 7$ i $\alpha 4\beta 2$ indueixen la sobre-expressió de la proteïna antiapoptòtica bcl-2 (18).

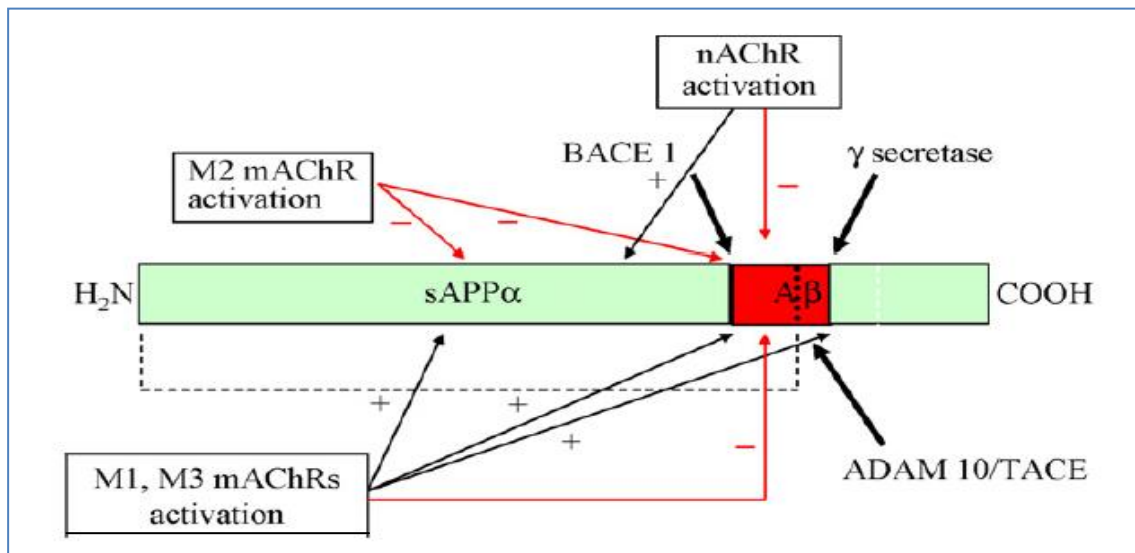


Fig.4 Regulació muscarínica i nicotínica del metabolisme de l'APP. Pákáski, M. 2008. Interaccions between the amyloid and cholinergic mechanisms in AD.

2.3 Memantina

La memantina és un antagonista moderat dels receptors NMDA. Redueix l'excitotoxicitat induïda pel glutamat *in vivo* i *in vitro* i preveu la neurodegeneració en els pacients d'Alzheimer. És efectiva en els estadis moderats i severos de la malaltia i va ser aprovada pel tractament de la MA per la FDA l'octubre del 2003 (28) (Fig.2).

2.4 Modificadors de la malaltia d'Alzheimer

Diferents estratègies farmacològiques s'han concentrat en reduir i/o modular la producció d'Aβ actuant en els diferents punts de la cascada amiloide; des de la seva producció i la seva deposició (vacunes, anticossos monoclonals contra varis epítops d'Aβ, teràpies antiqúelants) fins als seus efectes inflamatoris (inhibidors de la ciclo-oxigenasa 1 i 2) (29). Actualment s'estan desenvolupant inhibidors de la secretasa β capaços d'entrar dins dels endosomes de la cèl·lula, on es creu que té lloc majoritàriament el trencament de l'APP (30), així com antioxidants específics per la mitocondria com el MitoQ, en fase II d'assaigs clínics per la *Antipodean Pharmaceuticals Inc* (31).

Una altra via de desenvolupament de nous fàrmacs es basa en la combinació de dos o més farmacòfors capaços de modular simultàniament múltiples dianes farmacològiques. Aquests nous fàrmacs, se'ls ha anomenat lligands directes a múltiples dianes (32). En són exemples el ladostigil (TV3326) en fase II d'assaigs clínics (33), el lipocrine (34), la memoquina (35) i els IChE de lloc d'unió dual, capaços d'inhibir de forma simultània el lloc actiu i el lloc perifèric de l'AChE. L'estudi d'aquests últims ha estat l'objectiu principal d'aquest treball, per això els expliquem amb més detall en el proper apartat.

3. NOVES ESTRATÈGIES AMB ELS IChE: HUPRINES I HETERODÍMERS

Als anys noranta, amb l'objectiu d'incrementar l'afinitat dels IChE pel lloc actiu de l'enzim, es van començar a desenvolupar les huprines (Fig.5) per hibridació molecular de dos IChE coneguts, la tacrina i la (-)huperzina A. De forma contemporània, una estratègia conjuntiva diferent iniciada amb la tacrina va ser desenvolupada per Pang i cols. (36,37). Van dissenyar una nova classe de fàrmacs d'alta afinitat i de lloc d'unió dual combinant dues unitats de tacrina, unides per una cadena d'oligometilens (*linker*) de llargada adient per permetre la interacció simultània de les dues unitats amb els residus clau del lloc actiu i el lloc perifèric de l'enzim. El compost més actiu, la *bis(7)*-tacrina, té una activitat 150 vegades major que la tacrina davant de l'AChE en cervells de rata.

La combinació de l'estratègia d'hibridació, iniciada amb les huprines, amb l'estratègia d'unió de lloc dual desenvolupada per Pang i cols. (36,37) va permetre el disseny d'una nova sèrie de compostos, els heterodímers huprina-tacrina (Fig.5), que combinen una huprina Y amb una tacrina addicional unides per una cadena de set a nou carbonis.

3.1 Huprines

Les huprines combinen el sistema 4-aminoquinolina de la tacrina amb el pont carbocíclic de la (-)huperzina A compartint característiques d'ambdós models parenterals a l'hora d'unir-se a l'enzim (38). Els enantiòmers levògirs de la

huprina X i Y (ambdues amb un clor en la posició tres) han resultat ser les huprines més potents amb valors de les IC_{50} per l'AChEh de rang nanomolar.

Farmacològicament, estudis en hipocamp de rata mostren que tant la huprina X com la Y són agonistes dels receptors M1 (39). Paral·lelament, Canudas *et al.* (40) van trobar que la huprina Y prevenia de forma parcial la mort cel·lular induïda pel glutamat en cultius de cèl·lules de cerebel de rata. Per altra banda, estudis recents en el nostre laboratori, demostren que tant la huprina Y, com la X i la Z, inhibeixen l'agregació del pèptid PrP106-126 induïda per l'AChEb en un 84%, 69% i 89%, respectivament (19).

3.2 Heterodímers huprinaY-tacrina

Els heterodímers huprina Y-tacrina, IChE de lloc d'unió dual derivats de la dimerització d'una huprina Y i una tacrina o 6-clorotacrina (41) (Fig.5), van ser sintetitzats amb l'objectiu d'optimitzar el model de les huprines. S'intentava obtenir compostos amb una alta afinitat pel locus catalític de l'AChE i a la vegada amb efectes antiagregants $A\beta$ donada la seva condició d'inhibidors del lloc perifèric de l'enzim.

Les formes racèmiques d'aquests heterodímers van presentar valors de les IC_{50} per l'AChEh de rang nanomolar (0,29-0,5 nM), fins a 700 vegades més potents que la tacrina, i fins a tres vegades més potents que la huprina Y (41). Cal afegir, que també són capaços d'inhibir la BChEh, considerada d'interès pel tractament de la MA, donat que també metabolitza l'ACh i amb el progrés de la malaltia el ratio BChE/AChE augmenta.

Per altra banda, resultats preliminars en el nostre laboratori amb els heterodímers huprina Y-tacrina de vuit carbonis mostren significatius efectes antiagregants de la PrP106-126 i potents accions agonistes d'aquests fàrmacs sobre els receptors M1.

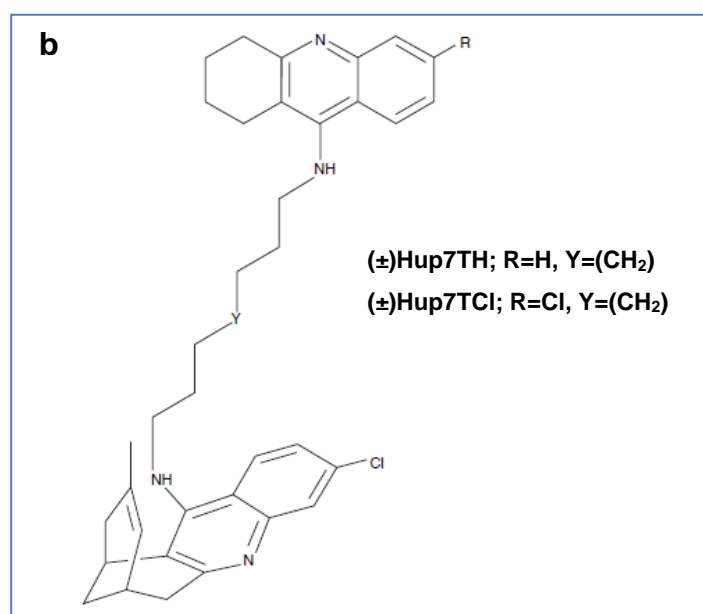
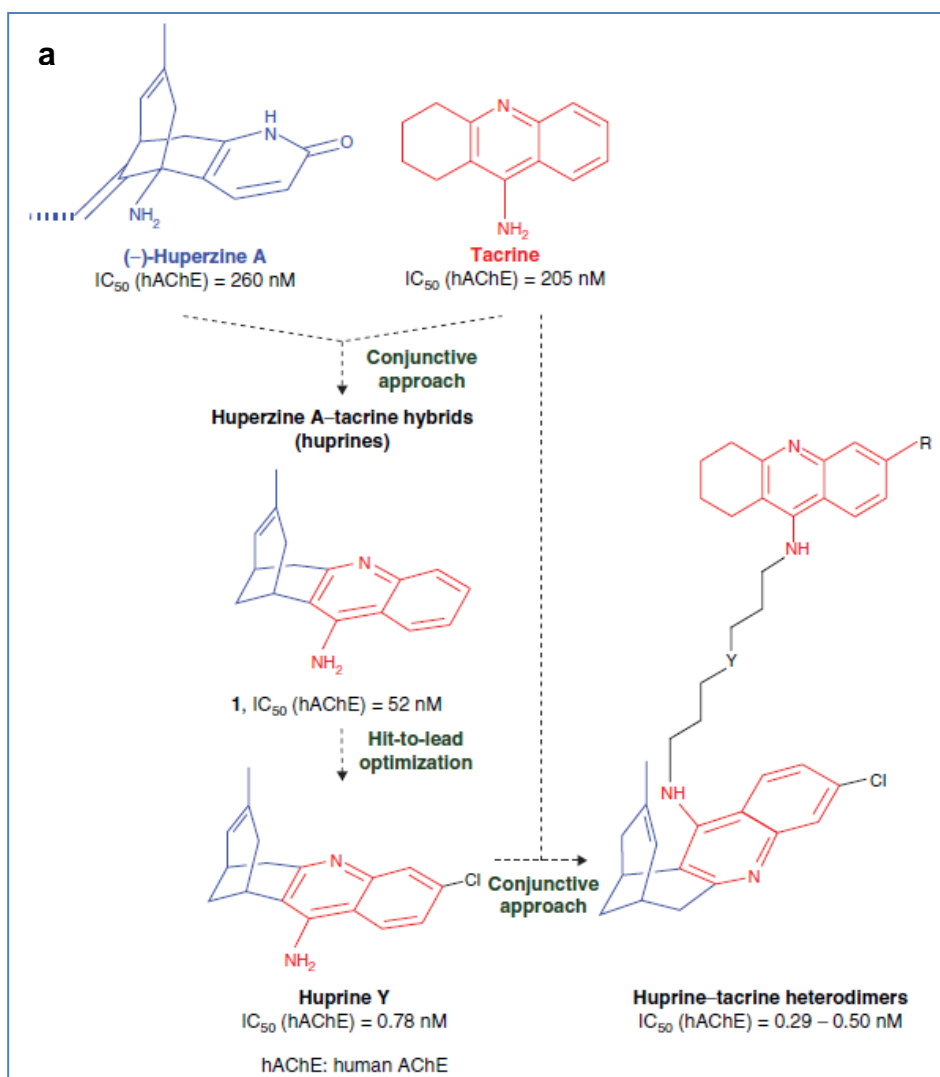


Fig.5 a.Desenvolupament de les huprines i els heterodímers huprina Y-tacrina per hibridació molecular a partir de la huperzina A i la tacrina. b.Estructura de les formes racèmiques dels heterodímers huprina Y-tacrina amb un *linker* de 7 carbonis: (±)Hup7TH i (±)Hup7TCI. MUÑOZ-TORRERO, D. 2008. *Huprines for Alzheimer's disease drug Development*.

IV. OBJECTIUS

IV. OBJECTIUS

Tal i com hem comentat anteriorment, un dels principals factors que intervé en el desenvolupament de la MA és l'agregació de la proteïna A β , i a més el procés degeneratiu que té lloc durant la malaltia induïx una pèrdua remarcable de l'activitat colinèrgica en el SNC. És per aquest motiu que en col·laboració amb el grup del Dr. Pelayo Camps del departament de Química Farmacèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, hem estudiat el perfil farmacològic dels anticolinesteràsics heterodimèrics Hup7TCl i Hup7TH, i en aquest sentit, els nostres objectius han estat:

1. Estudiar l'acció inhibidora dels heterodímers, i en especial les formes enantiomèriques, sobre les activitats de l'AChE_h (AChE humana recombinant) i la BChE_h (BChE humana), ambdues relacionades amb la hidròlisi de l'ACh.
2. Donat que aquests compostos han estat dissenyats per interaccionar en ambdós llocs de l'enzim AChE, el catalític i el perifèric, també hem estudiat la capacitat d'aquests compostos per inhibir l'agregació amiloïdogènica mitjançant l'agregació de la proteïna PrP106-126 induïda per l'AChE_b (AChE bovina).
3. Per últim, i donada la importància dels processos apoptòtics en les malalties neurodegeneratives, hem analitzat el possible efecte neuroprotector dels heterodímers Hup7TCl i Hup7TH en front de privació sèrica en cèl·lules SH-SY5Y de neuroblastoma humà.

V. MATERIAL I MÈTODES

V. MATERIAL I MÈTODES

1. MATERIAL

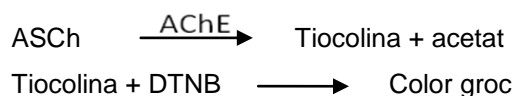
Tots els productes químics emprats en el present treball, van ser de la puresa adequada per a l'anàlisi: acetiltiocolina (ASCh) de *Sigma Aldrich* (St. Louis, EUA), acetonitril de *Merk* (Darmstadt, Alemanya), àcid clorhídric de *Panreac Química S.A.*, àcid 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoic) (DTNB) de *Sigma Aldrich*, bicarbonat sòdic (NaHCO_3) de *Merk*, butiriltiocolina (BSCh) de *Sigma Aldrich*, clorur de sodi (NaCl) de *Merk*, clorur de potassi (KCl) de *Merk*, dimetil sulfòxid (DMSO) de *Sigma Aldrich*, estreptomina de *Sigma Aldrich*, fosfat de potassi monobàsic (KH_2PO_4) de *Merk*, fosfat de sodi dibàsic dihidratat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) de *Merk*, glutamina de *Sigma Aldrich*, iodur de propidi de *Sigma Aldrich*, medi DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F12 Ham) amb 15 mM d'hepes i bicarbonat sòdic de *Gibco* (Maryland, USA), MEM solució d'aminoàcids no essencials de *Sigma Aldrich*, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazoli bromur (MTT) de *Sigma Aldrich*, penicil·lina de *Sigma Aldrich*, sèrum fetal boví de *Cultek* (Regne Unit), triton X-100 de *Sigma Aldrich*, i TRIS-hidroximetil-aminometà ultrapur de *MB Grade, USB* (Cleveland, Ohio, EUA). Els enzims: acetilcolinesterasa humana recombinant (AChEhr), acetilcolinesterasa bobina (AChEb), butirilcolinesterasa humana (BChEh) i tripsina-0,2 g EDTA, es van adquirir a *Sigma Aldrich*.

Les formes racèmiques i enantiomèriques dels fàrmacs Hup7TCl, Hup7TH, la huprina Y (HY) i la tacrina (THA) van ser sintetitzades pel laboratori de Química Farmacèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Les solucions patrons dels fàrmacs es van preparar en aigua bidestil·lada estèril al 45% de metanol a una concentració 1 mM, i es van conservar a 4°C. La concentració de metanol en els diferents assaigs va ser sempre inferior al 0,05%. Els pèptids prionics PrP106-126, PrP106-126-cumarina i PrP106-126 scrambled van ser sintetitzats i subministrats pel Laboratori di Chimica e Biochimica delle Proteïne. Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri. Milà. Itàlia.

2. MÈTODES

2.1 Determinació de l'activitat anticolinesteràsica *in vitro* dels heterodímers Hup7TCI i Hup7TH

L'activitat anticolinesteràsica dels heterodímers huprina Y-tacrina es va determinar espectrofotomètricament seguint el mètode descrit per Ellman (42). Aquest mètode es basa en la reacció següent:



La primera part de la reacció consisteix en la hidròlisi de l'ASCh per part de l'AChE produint-se com a metabòlits la tiocolina i l'acetat. En la segona part, la tiocolina s'uneix al reactiu DTNB i dóna un producte de color groc. La producció de color és indicadora de la quantitat d'ASCh degradada per l'AChE. Per determinar l'activitat de la BChE es segueix el mateix mètode, però en aquest cas, el substrat és la BSCh.

Per estudiar la capacitat inhibidora dels fàrmacs objecte d'estudi, es van afegir els inhibidors a concentracions creixents a la reacció de manera que desplaçessin el substrat de la seva unió amb l'enzim (AChEhr i BChEh), evitant així la seva hidròlisi. Aquestes concentracions creixents de fàrmacs es van afegir a una solució de incubació que contenia tampó fosfat 0,1 M pH 8, DTNB 333 mM i 0,02 U/ml d'enzim, i que es va deixar preincubar 20 minuts a 37°C, temps necessari perquè s'establís un equilibri entre la interacció del fàrmac i l'enzim. A continuació es va afegir l'ASCh o la BSCh a una concentració de 450 µM i 300 µM, respectivament, i es va deixar incubar 5 minuts a 37°C perquè la reacció entre el substrat i l'enzim tingués lloc. L'experiment es va realitzar en plaques de 96 pous i cada pou es va portar a un volum final de 300 µl. La producció del color groc es va mesurar a una longitud d'ona de 414 nm mitjançant l'espectrofotòmetre Perkin-Elmer Lambda 2 equipat amb un canviador automàtic de sis cèl·lules. Es van dur a terme un mínim de 4 experiments per duplicat per cada fàrmac inhibidor.

Les dades obtingudes van permetre construir les corbes de concentració-inhibició pels heterodímers mitjançant l'anàlisi de regressió no lineal utilitzant el programa *GraphPad* (*GraphPad software; San Diego, EUA*), la qual cosa va donar una estimació de la concentració inhibidora 50 (IC_{50}), és a dir, la concentració de fàrmac que inhibeix l'activitat de l'enzim al 50%. Els resultats es van expressar com la mitjana de la $IC_{50} \pm$ l'error estàndard de la mitjana (EMM).

2.2 Estudi de l'efecte antiagregant dels heterodímers Hup7TCI i Hup7TH en l'agregació amiloidogènica del pèptid PrP106-126 induïda per l'ACHÉ

Per a l'estudi de l'efecte antiagregant dels fàrmacs Hup7TCI i Hup7TH es va disposar del pèptid PrP106-126, pèptid sintètic homòleg a la regió 106-126 de la proteïna priònica humana (PrP) (43) marcat amb fluorescència amb una cumarina unida a un residu lisina (Lys). També es va disposar de la seqüència 106-126 scrambled igualment marcada amb cumarina com a pèptid control no agregant.

Prèvia la utilització dels pèptids, es va dur a terme una liofilització per millorar-ne les condicions de puresa. Els pèptids es van diluir, fins a arribar a una concentració de 0,5 mM, en una barreja d'aigua destil·lada i acetonitril al 50% (v/v) amb un pH no superior a 8. Una vegada diluïdes les mostres es van centrifugar a 12.000 rpm durant 11 minuts i posteriorment es van congelar a -80°C . Un cop congelades es va procedir a la liofilització dels pèptids priònics (19).

Posteriorment, es va incubar el pèptid priònic conjuntament amb els heterodímers Hup7TCI i Hup7TH en absència i presència d'ACHÉb. El pèptid PrP106-126 un cop liofilitzat va ser dissolt en tampó TRIS-HCl 100 mM (pH 7,5) per tal de que arribés a una concentració final de 500 μM al barrejar-se amb l'enzim i els fàrmacs. L'ACHÉb es va dissoldre en el mateix tampó i es va afegir a les mostres de PrP106-126 (500 μM) assolint una concentració final de 2,5 μM . Finalment, es van afegir els fàrmacs en quantitat suficient perquè arribessin a una concentració final de 100 μM . Les mostres es van deixar

incubar 48 hores a temperatura ambient. Com a control positiu es va utilitzar el propidi (inhibidor específic del lloc perifèric de l'enzim), també a 100 µM.

El volum final de tots els assaigs va ser de 30 µl. Tots els experiments es van realitzar per triplicat. Una vegada transcorregut el temps d'incubació corresponent, per aturar el procés d'agregació en el moment desitjat les mostres es van centrifugar a 12.000 rpm durant 11 minuts, se'n va eliminar el sobrenedant i els precipitats es van congelar pel seu posterior anàlisi (19).

2.2.1 Microscòpia de fluorescència i anàlisi d'imatges

Per l'anàlisi de les mostres els precipitats es van resuspendre en 10µl de tampó TRIS-HCl 100 mM (pH 7,5). 10 µl d'aquesta suspensió va ser dipositada de forma homogènia sobre un portaobjectes gelatinat i va ser observada al microscopi de fluorescència (*OLYMPUS BX51, Japan*) a 10x augments. El fluorocrom que marcava els pèptids era la cumarina, que s'excita a una longitud d'ona de 340 nm i emet a 405 nm, tenint en compte aquestes característiques, el filtre del microscopi de fluorescència que es va utilitzar va ser el DAPI. Tres imatges corresponents a tres camps diferents de cada preparació adquirides amb el microscopi de fluorescència van ser analitzades posteriorment amb el programa ImageJ (Versió 1.40g). De cada imatge es van analitzar les àrees dels tres agregats de mida màxima i es van fer les mitjanes corresponents per cada mostra i per cada tractament. A partir d'aquestes dades es va calcular el percentatge de reducció de la mida màxima dels agregats (MMA) de cada tractament en relació amb les dades de la MMA del grup PrP106-126 + AChEb.

2.3 Estudis de toxicitat i neuroprotecció amb els heterodímers Hup7TCI i Hup7TH en cèl·lules SH-SY5Y

2.3.1 Cultiu cel·lular

En els estudis de toxicitat i neuroprotecció es va utilitzar la línia cel·lular SH-SY5Y, cèl·lules de neuroblastoma derivades de tumors malignes avançats del sistema simpàtic adrenèrgic ganglial. Es van cultivar a 37°C en una atmosfera

humidificada que contenia CO₂ al 5%. El medi de creixement va ser el DMEM/F12, complementat amb sèrum fetal boví inactivat al 15% (v/v), glutamina 2 mM al 1,2% (v/v), aminoàcids no essencials al 1,2% (v/v), 100 U/ml de penicil·lina i 100 U/ml d'estreptomicina. Una vegada les cèl·lules van arribar al 80% de confluència es van sembrar en plaques de 96 pous. La densitat cel·lular a les plaques va ser de 175.000 cèl·lules/ml afegint 200µl/pou.

2.3.2 Estudis de toxicitat. Inducció de l'apoptosis i tractament farmacològic

Es van seleccionar els enantiòmers levògirs i les formes racèmiques dels heterodímers Hup7TCl i Hup7TH donat que havien resultat ser els compostos més actius davant de l'AChEhr. El marge de concentracions utilitzat va ser 10⁻⁶ M-10⁻⁹ M. Les diferents solucions es van preparar a partir d'una solució mare 10⁻⁴ M preparada amb H₂O bidestil·lada estèril sota campana a partir de la solució patró 10⁻³ M. Els experiments es van dur a terme en presència dels compostos parenterals huprina Y i tacrina a la concentració de 10⁻⁶ M.

Abans d'estudiar la capacitat neuroprotectora dels fàrmacs objecte d'estudi es va comprovar que no induïssin toxicitat en cèl·lules SH-SY5Y. Els fàrmacs dissolts en el medi de cultiu es van afegir a les 24 hores d'haver sembrat les cèl·lules i es van deixar incubar durant 24 hores més. A continuació es va realitzar l'assaig de viabilitat cel·lular (MTT).

Posteriorment, i a fi d'analitzar la possible acció neuroprotectora dels fàrmacs, es van establir les condicions experimentals per la inducció de l'apoptosis per privació sèrica: 0% de sèrum per un període de 24 hores van induir un 50% de reducció de la viabilitat cel·lular. Els fàrmacs es van afegir a les 24 hores d'haver sembrat les cèl·lules de forma concomitant amb la privació sèrica. Finalment, es va realitzar l'assaig de viabilitat cel·lular (MTT).

2.3.3 Assaig de determinació de la viabilitat cel·lular

Per avaluar els processos de toxicitat i apoptosis es va analitzar la viabilitat cel·lular mitjançant la reducció del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazoli bromidi (MTT). Els mitocondris actius de les cèl·lules vives poden reduir el MTT per produir formazan, la quantitat del qual està directament relacionada amb el nombre de cèl·lules vives. Per determinar la viabilitat de les cèl·lules després dels diferents tractaments es va afegir al cultiu el MTT (100 µl per pou) dissolt en medi sense sèrum a una concentració de 0,5 mg/ml durant dues hores. Es van eliminar les restes de medi i es va dissoldre el formazan resultant en DMSO (50 µl per pou). La quantitat final de formazan va ser quantificada mitjançant la determinació de l'absorbància a les longituds d'ona de (λ) 595 nm i 620 nm utilitzant l'espectrofotòmetre Multiskan (*Labsystems multiskan MS, type 352*). L'absorbància final és el resultat de la diferència d'absorbàncies: l'absorbància a 595 menys l'absorbància a 620.

Els percentatges de supervivència dels diferents grups de tractament han estat calculats emprant la fórmula següent (44) :

$$\% \text{ Supervivència} = \frac{\text{Supervivència (fàrmac i -serum)}}{\text{Supervivència (control o medi de cultiu sol)}} \times 100$$

3. ANÀLISI ESTADÍSTICA

En tots els casos, els resultats s'han expressat com la mitjana ± EEM, com a mínim de tres experiments realitzats per triplicat.

Per analitzar les diferències entre els grups de tractament es va utilitzar el test de la *t* de Student de dues cues per grups desaparellats. Per comprovar les mitjanes de més de dos grups es va fer servir el test d'anàlisi de la variància (ANOVA) d'un factor seguit del test de Dunnett o del de Tukey. El nivell de significació es va fixar en $p < 0,05$.

VI. RESULTATS

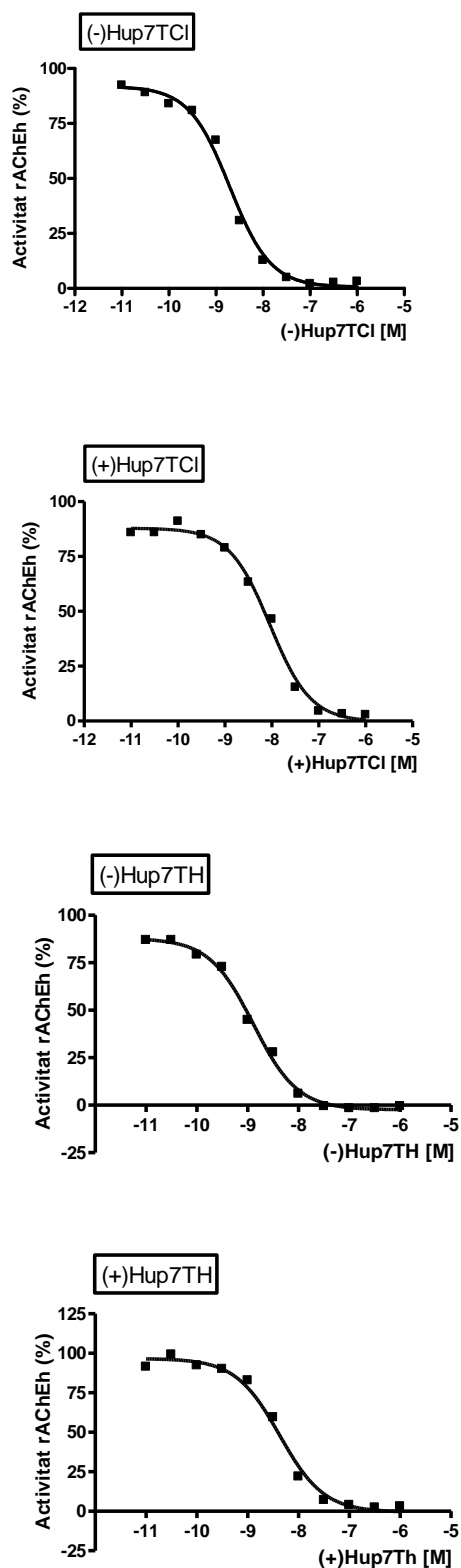
VI. RESULTATS

1. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT ANTICOLINESTERÀSICA *IN VITRO* DELS HETERODÍMERS HUP7TCI I HUP7TH

Per determinar les IC_{50} dels heterodímers Hup7TCI i Hup7TH, és a dir, la concentració necessària per inhibir l'activitat màxima de l'enzim en un 50%, es van realitzar les corbes d'inhibició de les formes racèmiques i enantiomèriques (Fig.6) de cada un dels fàrmacs tant per l'AChEhr com per la BChEh. Les corbes es van determinar per duplicat a raó de dotze concentracions per cada inhibidor, i es van fer un mínim de quatre experiments per cada compost i per cada enzim. L'absència d'inhibidors va representar la màxima activitat enzimàtica (100%), i es va utilitzar per calcular el percentatge d'inhibició de l'enzim per cadascuna de les concentracions de fàrmac. Els mateixos experiments es van dur a terme per la huprina Y i la tacrina per tal de poder comparar les dades obtingudes dels heterodímers amb les dades dels seus compostos parenterals.

A la taula 1 es representen els valors de les IC_{50} corresponents a la inhibició de l'AChEhr i de la BChEh per les formes racèmiques i enantiomèriques dels compostos Hup7TCI i Hup7TH, utilitzant la huprina Y i la tacrina, com a fàrmacs de referència. En tots els casos, els fàrmacs estudiats van presentar més afinitat per l'AChEhr que per la BChEh. Entre les diferents formes dels heterodímers, els enantiòmers levògirs són els que es van mostrar més actius a l'hora d'inhibir l'AChEhr ((-)Hup7TH 1,33 nM i (-)Hup7TCI 2,04 nM). Respecte a la BChEh, els compostos més afins van resultar ser el (+)Hup7TCI (55,98 nM) i el (±)Hup7TH (87,09 nM). La sèrie Hup7TH es va mostrar més activa a l'hora d'inhibir l'AChEhr que la sèrie Hup7TCI (Taula 1), contràriament al que va passar amb la BChEh.

a. AChEh



b. BChEh

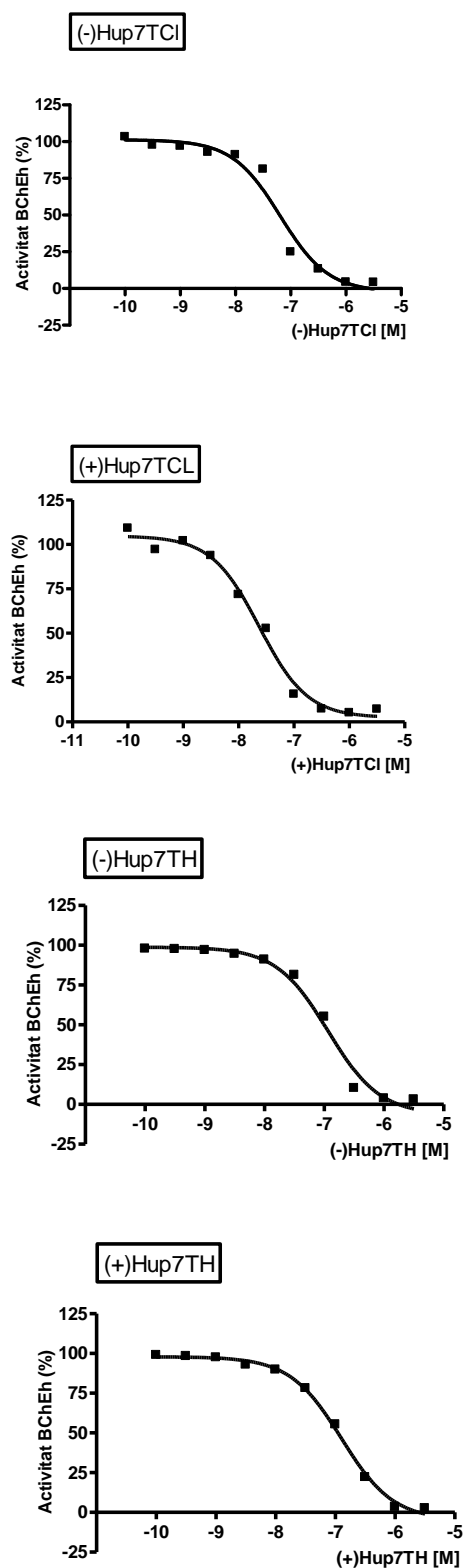


Fig.6 Sigmoidees corresponents a les activitats anticolinesteràsiques dels enantiòmers (-)Hup7TCI, (+)Hup7TCI, (-)Hup7TH i (+)Hup7TH a diferents concentracions davant de a. l'AChEh i b. la BChEh. (-) =enantiòmer levògic; (+) =enantiòmer dextrògic. Els valors expressen la mitjana de cada concentració realitzada per duplicat amb un total de 12 concentracions.

Compost	AChEhr		BChEh	
	IC ₅₀ (nM)	n	IC ₅₀ (nM)	n
(±)Hup7TCI	3,83 ± 0,29	6	73,27 ± 5,97	8
(-)Hup7TCI	2,04 ± 0,20	4	86,76 ± 4,16	8
(+)Hup7TCI	11,51 ± 1,00	7	47,37 ± 4,39	6
(±)Hup7TH	1,82 ± 0,13	13	87,09 ± 4,24	6
(-)Hup7TH	1,33 ± 0,08	13	132,76 ± 4,08	6
(+)Hup7TH	5,82 ± 0,15	5	138,92 ± 5,24	8
THA	356,65 ± 25,5	15	24,81 ± 0,56	8
HY	0,62 ± 0,03	9	175,28 ± 6,28	8

Taula 1 Activitat inhibidora *in vitro* dels heterodímers Hup7TCI i Hup7TH, de la tacrina (THA) i de la huprina Y (HY) sobre l'activitat dels enzims AChEhr i BChEh. (±) =compost racèmic; (-) =enantiòmer levògir; (+) =enantiòmer dextrògir. Els valors expressen la mitjana ± EEM (error estàndard de la mitjana) del nombre d'experiments indicats (n), realitzats per triplicat.

2. ESTUDI DE L'EFECTE DELS HETERODÍMERS HUP7TCI I HUP7TH EN L'AGREGACIÓ AMILOIDOGÈNICA DEL PÈPTID PrP106-126 INDUÏDA PER L'ACHÉ

Donat que s'ha descrit que l'efecte proagregant de l'ACHÉ sobre el pèptid A β segueix un procés similar al que es produeix sobre el pèptid PrP106-126, i s'ha demostrat que inhibidors específics del lloc perifèric de l'enzim bloquegen aquest efecte, es va estudiar l'efecte dels heterodímers Hup7TCI i Hup7TH, l'ACHÉ dissenyats per inhibir tant el lloc catalític com el lloc perifèric de l'enzim, en el procés d'agregació amiloidogènica del pèptid PrP106-126 induïda per l'ACHÉb. A més a més, estudis realitzats en el nostre laboratori, mostren que les huprines, compostos parenterals dels heterodímers objecte d'estudi, presenten un clar efecte inhibidor de l'agregació induïda per l'ACHÉb sobre el pèptid PrP106-126.

L'efecte d'aquests heterodímers sobre l'agregació de la PrP106-126 induïda per l'ACHÉb es va determinar a les 48 hores d'incubació i l'agregació es va analitzar mitjançant microscopia de fluorescència. Els dos dímers en totes les seves formes, racèmiques i enantiomèriques, van revertir de forma significativa l'efecte agregant induït per l'ACHÉb amb valors de MMA molt propers al grup control, no mostrant diferències estadísticament significatives entre els grups (Fig. 8).

3. ESTUDIS DE TOXICITAT I NEUROPROTECCIÓ DELS HETERODÍMERS HUP7TCI I HUP7TH EN CÈL·LULES SH-SY5Y

Atès que hi ha estudis que indiquen que la tacrina té efectes neuroprotectors, i experiments previs realitzats en el nostre laboratori demostren una recuperació de la viabilitat cel·lular en cèl·lules PC12 tractades amb huprina Y, un dels nostres objectius va ser estudiar el possible efecte neuroprotector dels heterodímers Hup7TCI i Hup7TH, compostos derivats dels anteriors, davant de la mort cel·lular induïda per privació sèrica.

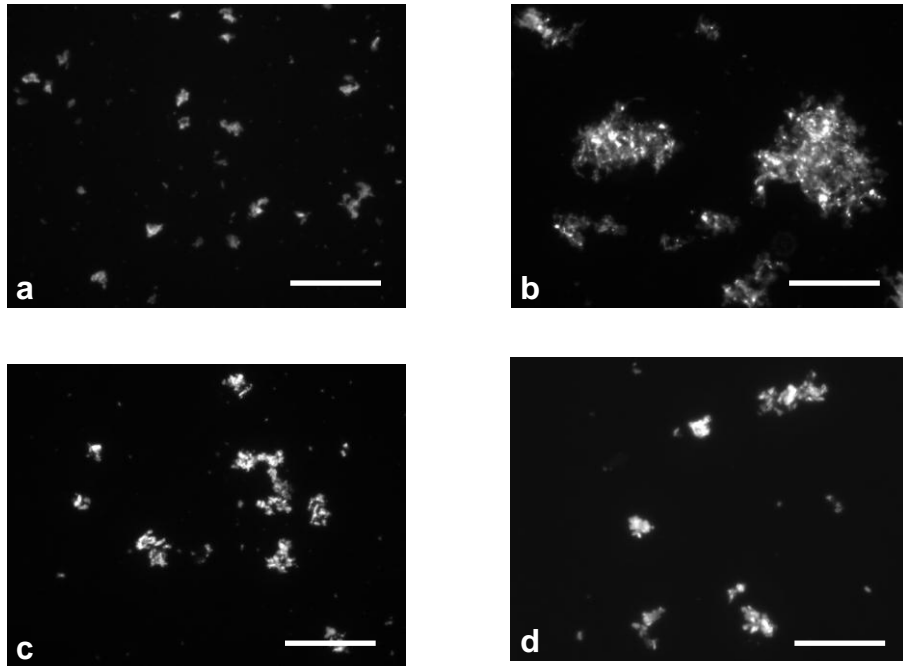


Fig.7 Imatges representatives de microfotografia fluorescent de a. PrP106-126 500 μM , b. Prp106-126 500 μM + AChE 2,5 μM , c. PrP106-126 500 μM + AChE 2,5 μM + (\pm)Hup7TCI 10^{-4} M i d. PrP106-126 500 μM + AChE 2,5 μM + (\pm)Hup7TH 10^{-4} M, durant 48 hores de incubació a temperatura ambient. Les imatges mostren com el tamany dels agregats disminueix en presència dels fàrmacs, posant de manifest la seva capacitat inhibidora davant de l'agregació de la PrP106-126 induïda per l'AChEb. Barra, 100 μm . Augments 10x.

Estudi de l'efecte antiagregant dels heterodímers Hup7TCI i Hup7TH

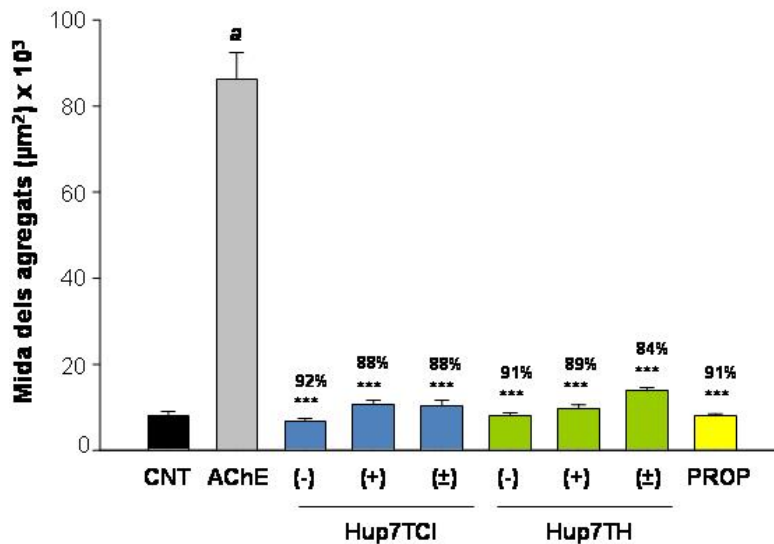


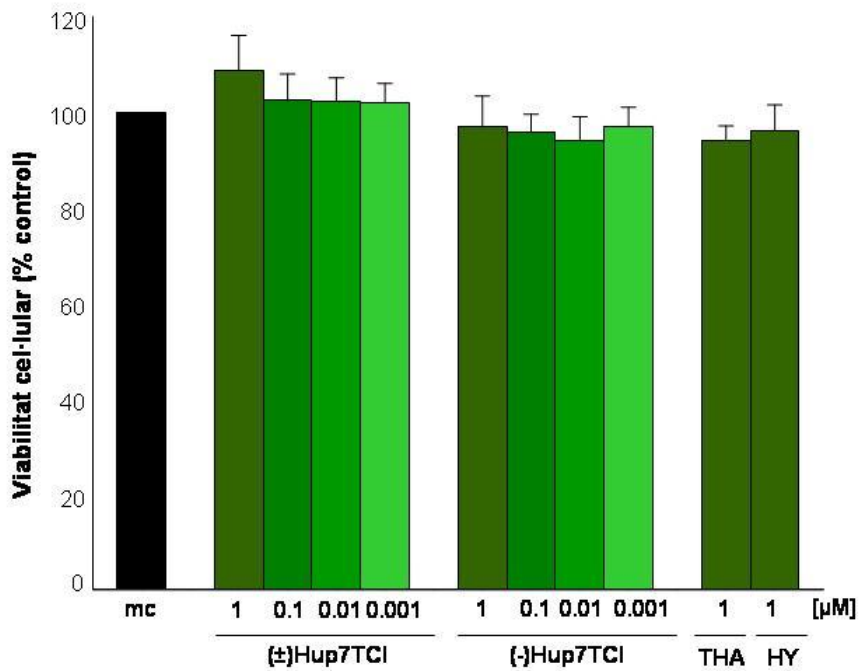
Fig.8 Determinació de la capacitat inhibidora de l'agregació de PrP106-126 (500 μM) induïda per l'AChEb (2,5 μM) dels heterodímers Hup7TCI i Hup7TH (10^{-4} M), i el iodur de propidi (PROP) (10^{-4} M). Els valors sobre les barres representen el percentatge d'inhibició de la MMA induït pels diferents fàrmacs. CNT = control; (\pm) =compost racèmic; (-) =enantiòmer levògic; (+) =enantiòmer dextrògic. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm EEM de la mida màxima dels agregats (MMA; μm^2) de com a mínim tres experiments realitzats per triplicat. a $p < 0,001$ respecte al control; *** $p < 0,001$ respecte a l'AChEb.

En primer lloc, es va fer un estudi de toxicitat amb els heterodímers Hup7TCI i Hup7TH i els seus compostos parenterals huprina Y i tacrina per descartar l'opció de que aquests fossin neurotòxics. Es van seleccionar els enantiòmers levògirs i els compostos racèmics donat que havien resultat ser els més actius a l'hora d'inhibir l'AChEhr. Amb aquest objectiu es va utilitzar la reducció del MTT a formazan en cèl·lules SH-SY5Y de neuroblastoma humà per detectar possibles canvis en la viabilitat. Els fàrmacs van ser estudiats en un ampli marge de concentracions (10^{-6} M- 10^{-9} M) i van ser incubats durant un període de 24 hores. Tal i com es pot observar a la figura 9, la incubació d'aquests compostos no va modificar en cap cas la viabilitat cel·lular.

En segon lloc, es va procedir a realitzar l'estudi de l'efecte d'aquests heterodímers en front de privació sèrica durant 24 hores en cèl·lules SH-SY5Y a les mateixes concentracions utilitzades anteriorment (10^{-6} M- 10^{-9} M).

Entre totes les formes dels heterodímers estudiats, només es va observar una lleugera recuperació de la viabilitat cel·lular (no significativa estadísticament) en presència del (\pm)Hup7TCI (10^{-7} M i 10^{-8} M), assolint-se uns nivells de supervivència cel·lular un 23% superior respecte al control negatiu (medi sense sèrum) (Fig.10).

Estudi de toxicitat de l'heterodímer Hup7TCI



Estudi de toxicitat de l'heterodímer Hup7TH

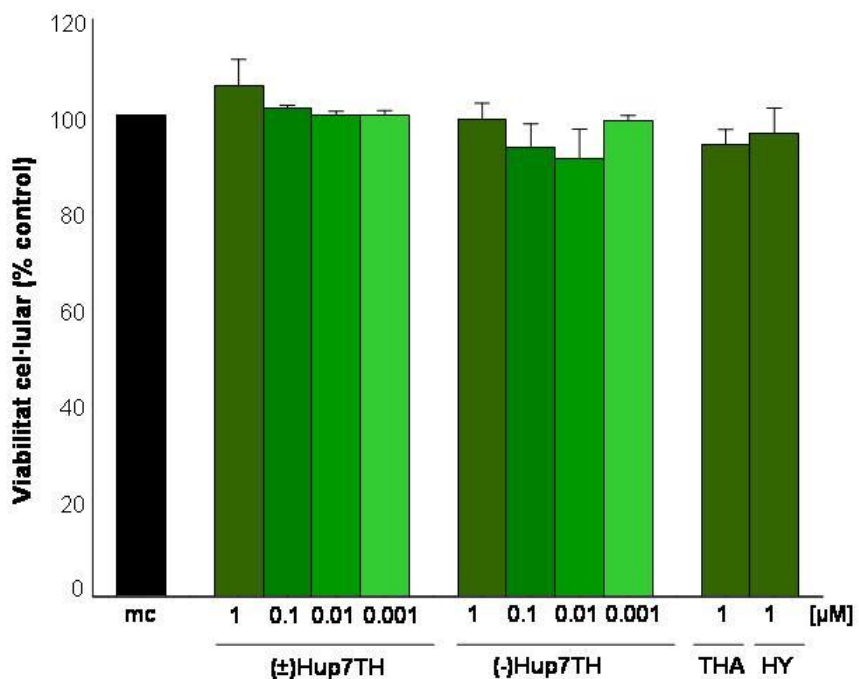
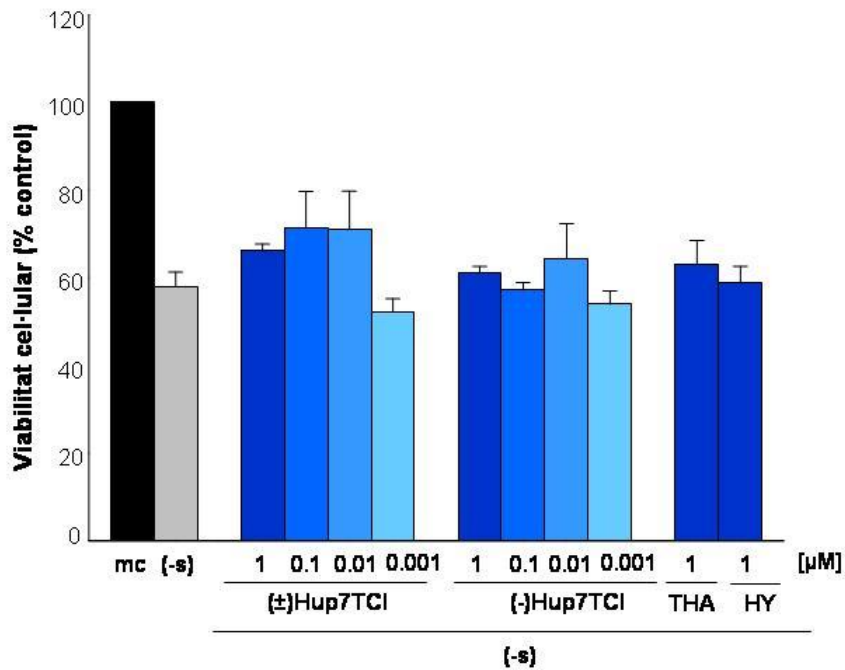


Fig.9 Efecte dels heterodímers Hup7TCI, Hup7TH, la tacrina (THA) i la huprina Y (HY) sobre la viabilitat cel·lular en cèl·lules SH-SY5Y durant un període de 24h. L'Hup7TCI i l'Hup7TH es van afegir a diferents concentracions (1- 0,001 μM). La THA i la HY es van afegir a 1 μM. mc =medi complet; (±) =compost racèmic; (-) =enantiòmer levògir. Els valors s'expressen en mitjanes ± EEM com a % del valor control de tres experiments realitzats per triplicat.

Estudi de neuroprotecció de l'heterodímer Hup7TCI



Estudi de neuroprotecció de l'heterodímer Hup7TH

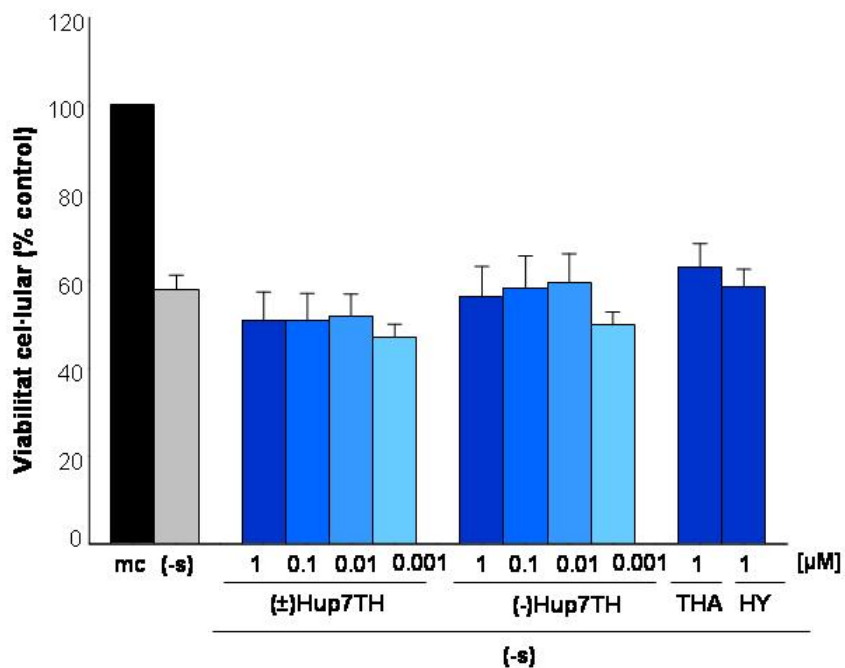


Fig.10 Efecte dels heterodímers Hup7TCI, Hup7TH, la tacrina (THA) i la huprina Y (HY) sobre la reducció de la viabilitat cel·lular induïda per privació sèrica en cèl·lules SH-SY5Y. L'Hup7TCI i l'Hup7TH es van estudiar a diferents concentracions (1- 0,001 μM); la THA i la HY a 1 μM. Els fàrmacs es van afegir de forma concomitant amb el medi privat de sèrum i es van deixar un període de 24h. mc =medi complet; (-s) =privació sèrica; (±) =compost racèmic; (-) =enantiòmer levògir. Els valors s'expressen en mitjanes ± EEM com a % del valor control de tres experiments realitzats per triplicat.

VII. DISCUSSIÓ

VII. DISCUSSIÓ

La hipòtesi colinèrgica com a causa de la disfunció cognitiva existent en els processos neurodegeneratius de la malaltia d'Alzheimer, ha determinat que les aproximacions farmacològiques pel seu tractament hagin estat basades clàssicament en la facilitació de la neurotransmissió colinèrgica a diferents nivells. Entre els compostos emprats pel tractament de la MA, els IChE (45) són els que han resultat ser de major utilitat, tanmateix, l'existència de compostos d'eficàcia limitada i múltiples efectes indesitjats ha fet que incrementi l'interès pel desenvolupament de nous inhibidors amb una millor eficàcia terapèutica.

En aquest treball hem centrat la nostra atenció en estudiar les accions dels anticolinesteràsics Hup7TCl i Hup7TH, heterodímers derivats de la huprina Y i la tacrina, tant en aquelles accions relacionades amb la seva activitat farmacològica principal, inhibir l'AChE, com en aquelles no relacionades i que també són de gran interès en el desenvolupament de la MA: l'agregació amiloidogènica i la neuroprotecció.

En primer lloc, es van determinar les capacitats inhibidores d'aquests compostos en totes les seves formes (racèmiques, levògires i dextrògires) davant de l'AChE_h, i de la BChE_h. Els resultats obtinguts van mostrar clarament que els dos heterodímers huprina Y-tacrina estudiats, Hup7TCl i Hup7TH, són dos potents inhibidors de l'AChE_h amb valors de les IC₅₀ de rang nanomolar. Tot i així, al comparar les IC₅₀ de les formes racèmiques davant de l'AChE_h ($3,83 \pm 0,29$ nM i $1,82 \pm 0,13$ nM pel (\pm)Hup7TCl i el (\pm)Hup7TH, respectivament) amb les corresponents IC₅₀ envers l'AChE_h (0,25-0,5 nM) (41) veiem que són compostos més potents a l'hora d'inhibir l'AChE_h que a l'hora d'inhibir l'AChE_r. Les diferències observades entre els valors de les IC₅₀ dels compostos racèmics obtinguts amb anterioritat podrien ser degudes a les modificacions metodològiques introduïdes, així com al tipus d'AChE emprada, en aquest cas l'AChE_r (41).

Entre totes les formes dels heterodímers estudiats, les més actives en front de l'AChEhr van resultar ser els enantiòmers levògirs (-)Hup7TCI i (-)Hup7TH, amb unes IC_{50} de $2,04 \pm 0,20$ nM i $1,33 \pm 0,08$ nM, respectivament; mostrant-se la sèrie Hup7TH lleugerament més potent que la sèrie Hup7TCI. Respecte a la seva activitat davant de la BChEh, els dos heterodímers van mostrar valors de les IC_{50} superiors als obtinguts davant de l'AChEhr, indicant que són compostos més afins per l'AChEhr que per la BChEh (Taula 1). La raó entre les IC_{50} $BChEh/IC_{50}$ $AChEhr$ és aproximadament de 43 pel (-)Hup7TCI i de 100 pel (-)Hup7TH.

Nombroses evidències mostren que la BChE també juga un paper important en la hidròlisi de l'ACh, per la qual cosa la seva inhibició també podria aportar beneficis terapèutics. En el cervell sà, l'AChE suposa un 80% del total de les colinesterases, mentre que la BChE representa tan sols un 20% (46), considerant-se que aquesta última juga un paper poc important en la regulació dels nivells d'ACh. Tanmateix, això no és així en els cervells de pacients amb MA en els que l'activitat de l'AChE pot disminuir fins a un 55-67% dels valors normals i en canvi la BChE augmenta la seva activitat. Per tant, ambdós enzims semblen estar implicats en la regulació dels nivells d'ACh, podent-se considerar així dos objectius sobre els que incidir per millorar el dèficit colinèrgic (47). El fet de que els inhibidors Hup7TCI i Hup7TH, tant les formes racèmiques com els seus enantiòmers, produeixin també una inhibició considerable sobre la BChE representa una característica de gran interès d'aquests compostos.

S'ha descrit que l'AChE a través del lloc aniònic perifèric constitueix un important cofactor en la fibrillogènesi del pèptid A β , essent capaç d'interaccionar amb els agregats amiloidogènics formant complexos macromoleculars de gran estabilitat (24,48). Estudis previs realitzats en el nostre laboratori, han mostrat que aquest efecte proagregant de l'AChE envers l'A β , també es dona envers el pèptid priònic PrP106-126 i el PrP82-146 seguint un procés molt similar (19,20). Aquest efecte és bloquejat pel iodur de propidi, compost que s'uneix de forma específica al lloc perifèric de l'AChE. També s'ha demostrat que les huprines bloquegen l'agregació de la PrP106-126 induïda per l'AChE (19). Així, ens vam

plantejar estudiar l'efecte dels heterodímers huprina Y-tacrina, inhibidors de lloc d'unió dual derivats de la huprina Y, sobre l'agregació del pèptid PrP106-126 induïda per l'AChEb. En aquest sentit, en incubar els heterodímers en presència d'AChEb, es va observar una clara i significativa inhibició (al voltant d'un 90%) de l'agregació de la PrP106-126 induïda per l'enzim. La capacitat inhibidora dels diferents compostos va ser similar, no observant-se cap diferència entre les diferents formes de cada grup de compostos, ni entre els compostos clorats i hidrogenats (Fig.8). Aquests resultats ens confirmen la naturalesa dual d'aquests heterodímers com a inhibidors del lloc catalític i del lloc perifèric de l'enzim simultàniament. Per altra banda, sembla ser que l'afinitat d'aquests compostos pel lloc catalític és completament independent de la del lloc perifèric, no existint una relació entre ambdues accions (24).

Tal i com s'ha descrit a la introducció, una altra de les accions d'interès pel que fa als IChE com a agents terapèutics davant de les malalties neurodegeneratives és la neuroprotecció. Estudis pre-clínic mostren que els quatre IChE comercialitzats (tacrina, donepezil, galantamina i rivastigmina) presenten efectes neuroprotectors *in vitro* i *in vivo* contra estímuls neurotòxics. Protegeixen contra la toxicitat induïda pel glutamat en cultius primaris de neurones corticals de rata (49), la induïda per l'A β en cultius primaris de neurones colinèrgiques septals de rata (50), cèl·lules SH-SY5Y (51) o ratolins (52). També s'han descrit efectes neuroprotectors en diferents models de privació d'oxigen i de glucosa de neurones danyades (53). Aquests efectes neuroprotectors semblen ser independents de la seva interacció amb l'AChE, i es donen, en general, a concentracions més elevades que la IC₅₀ per l'AChE (54). Hi ha estudis que demostren diferents mecanismes d'acció com ara que siguin antagonistes dels receptors NMDA, que indueixin la sobreexpressió de la proteïna antiapoptòtica bcl-2 (18), que regulin a l'alça la variant neuroprotectora de l'AChE (16) o que activin de forma directa o indirecta els receptors muscarínics M1 i M3 i els nicotínics subtipus $\alpha 3$, $\alpha 7$ i $\alpha 4\beta 2$ els quals estimulen la via no amiloidogènica de l'APP (17).

Estudis previs també han demostrat que la huprina Y presenta un efecte protector davant del glutamat en cultius de cèl·lules granulars i també davant

de lesions estriatals induïdes per l'àcid 3-nitropropioníic (40). Paral·lelament, en el nostre laboratori s'han obtingut resultats de recuperació de la viabilitat cel·lular davant de peròxid d'hidrogen, en cèl·lules PC12 tractades amb huprines.

Donat que els dos compostos parenterals dels heterodímers huprina Y-tacrina mostren efectes neuroprotectors, es van realitzar una sèrie d'experiments amb el fi d'analitzar la possible acció neuroprotectora dels heterodímers Hup7TCI i Hup7TH en cèl·lules SHSY-5Y. Quan els fàrmacs (10^{-6} M- 10^{-9} M) van ser incubats en absència de sèrum per tal d'estudiar la possible acció protectora davant d'un procés apoptòtic, els compostos hidrogenats (\pm)Hup7TH i (-)Hup7TH no van restaurar la mort cel·lular induïda per privació sèrica. Només en el cas del derivat clorat (\pm)Hup7TCI, es va observar un lleuger increment de la viabilitat cel·lular d'un 71% a les concentracions de 10^{-7} M i 10^{-8} M, sense que aquests nivells arribessin a ser significatius estadísticament (Fig.10).

En estudis realitzats amb diferents IChE (donepezil, galantamina i tacrina) en neurones corticals front a l'agressió causada pel glutamat, es va observar que l'efecte protector d'aquests IChE, era més pronunciat com més llarg era el temps de incubació, no observant-se efecte neuroprotector quan els IChE eren afegits al medi de manera concomitant amb el glutamat (49). El fet que el compost Hup7TCI doni protecció sense preincubació indica el possible potencial neuroprotector d'aquest fàrmac, així com la possibilitat de que al augmentar el temps d'incubació o preincubació del seu homòleg Hup7TH també pugui mostrar protecció. Actualment, s'estan duent a terme més experiments amb l'objectiu d'analitzar l'efecte d'aquests heterodímers en front a diferents estímuls tòxics com pot ser l' H_2O_2 sota condicions tant necròtiques com apoptòtiques, i trobar el mecanisme a través del qual es produeix.

VIII. CONCLUSIONS

VIII. CONCLUSIONS

Dels resultats obtinguts en el present treball, en relació al perfil farmacològic dels fàrmacs heterodímers huprina Y-tacrina de cadena d'unió de set carbonis, Hup7TCI i Hup7TH, destaquem els aspectes següents:

1. Totes les formes d'ambdós heterodímers Hup7TCI i Hup7TH (compostos racèmics, enantiomèrs dextrògirs i levògirs) són potents inhibidors del lloc catalític de l'ACHeR essent els compostos hidrogenats (Hup7TH) lleugerament més potents que els seus homòlegs clorats (Hup7TCI).
2. Totes les formes d'ambdós heterodímers Hup7TCI i Hup7TH (compostos racèmics, enantiomèrs dextrògirs i levògirs) reverteixen l'efecte proagregant de l'ACHeB sobre el pèptid PrP106-126, associat al lloc perifèric de l'enzim. Per tant, són també potents inhibidors del lloc perifèric de l'ACHeB amb percentatges d'inhibició semblants als descrits pel iodur de propidi a una concentració de 100 μ M.
3. Pel que fa als estudis de neuroprotecció cap dels compostos estudiats ha mostrat efectes neuroprotectors significatius, si bé el compost racèmic Hup7TCI va presentar una clara tendència a augmentar la viabilitat cel·lular en absència de sèrum. En cap cas, els compostos estudiats van mostrar efectes tòxics en les cèl·lules SH-SY5Y en el marge de concentracions estudiat.
4. Com a conclusió final podem dir que els heterodímers huprina Y-tacrina estudiats en aquest treball poden ser considerats com a fàrmacs potencialment útils en el tractament de la MA.

IX. BIBLIOGRAFIA

IX. BIBLIOGRAFIA

1. **Klafki, H. W., M. Staufenbiel, J. Kornhuber, and J. Wiltfang.** 2006. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Brain* **129**:2840-2855.
2. **Munoz-Torrero, D. and P. Camps.** 2006. Dimeric and hybrid anti-Alzheimer drug candidates. *Curr. Med. Chem.* **13**:399-422.
3. **Selkoe, D. J. and D. Schenk.** 2003. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**:545-584.
4. **Giannakopoulos, P., F. R. Herrmann, T. Bussiere, C. Bouras, E. Kovari, D. P. Perl, J. H. Morrison, G. Gold, and P. R. Hof.** 2003. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* **60**:1495-1500.
5. **Blennow, K., M. J. de Leon, and H. Zetterberg.** 2006. Alzheimer's disease. *Lancet* **368**:387-403.
6. **Tanzi, R. E. and L. Bertram.** 2005. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* **120**:545-555.
7. **Salloway, S., J. Mintzer, M. F. Weiner, and J. L. Cummings.** 2008. Disease-modifying therapies in Alzheimer's disease. *Alzheimers. Dement.* **4**:65-79.
8. **Seabrook, G. R., W. J. Ray, M. Shearman, and M. Hutton.** 2007. Beyond amyloid: the next generation of Alzheimer's disease therapeutics. *Mol. Interv.* **7**:261-270.
9. **Mudher, A. and S. Lovestone.** 2002. Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci.* **25**:22-26.
10. **Davies, P. and A. J. Maloney.** 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **2**:1403.
11. **Geula, C., N. Nagykery, A. Nicholas, and C. K. Wu.** 2008. Cholinergic neuronal and axonal abnormalities are present early in aging and in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **67**:309-318.
12. **Ringman, J. M. and J. L. Cummings.** 2006. Current and emerging pharmacological treatment options for dementia. *Behav. Neurol.* **17**:5-16.
13. **Birks, J.** 2006. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD005593.
14. **Wang, X.-D., X.-Q. Chen, H.-H. Yang, and G.-Y. Hu.** 1999. Comparison of the effects of cholinesterase inhibitors on [³H]MK-801 binding in rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* **272**:21-24.

15. **Mancini, F., M. Naldi, V. Cavrini, and V. Andrisano.** 2007. Multiwell fluorometric and colorimetric microassays for the evaluation of beta-secretase (BACE-1) inhibitors. *Anal. Bioanal. Chem.* **388**:1175-1183.
16. **Francis, P. T., A. Nordberg, and S. E. Arnold.** 2005. A preclinical view of cholinesterase inhibitors in neuroprotection: do they provide more than symptomatic benefits in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol. Sci.* **26**:104-111.
17. **Zimmermann, M., F. Gardoni, E. Marcello, F. Colciaghi, B. Borroni, A. Padovani, F. Cattabeni, and M. Di Luca.** 2004. Acetylcholinesterase inhibitors increase ADAM10 activity by promoting its trafficking in neuroblastoma cell lines. *J. Neurochem.* **90**:1489-1499.
18. **Nordberg, A.** 2006. Mechanisms behind the neuroprotective actions of cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **20**:S12-S18.
19. **Pera, M., S. Roman, M. Ratia, P. Camps, D. Munoz-Torrero, L. Colombo, C. Manzoni, M. Salmona, A. Badia, and M. V. Clos.** 2006. Acetylcholinesterase triggers the aggregation of PrP 106-126. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**:89-94.
20. **Pera, M., A. Martinez-Otero, L. Colombo, M. Salmona, D. Ruiz-Molina, A. Badia, and M. V. Clos.** 2008. Acetylcholinesterase as an amyloid enhancing factor in prp82-146 aggregation process. *Mol. Cell Neurosci.*
21. **Inestrosa, N. C., A. Alvarez, C. A. Perez, R. D. Moreno, M. Vicente, C. Linker, O. I. Casanueva, C. Soto, and J. Garrido.** 1996. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* **16**:881-891.
22. **Alvarez, A., R. Alarcon, C. Opazo, E. O. Campos, F. J. Munoz, F. H. Calderon, F. Dajas, M. K. Gentry, B. P. Doctor, F. G. De Mello, and N. C. Inestrosa.** 1998. Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. *J. Neurosci.* **18**:3213-3223.
23. **Reyes, A. E., M. A. Chacon, M. C. Dinamarca, W. Cerpa, C. Morgan, and N. C. Inestrosa.** 2004. Acetylcholinesterase-Abeta complexes are more toxic than Abeta fibrils in rat hippocampus: effect on rat beta-amyloid aggregation, laminin expression, reactive astrocytosis, and neuronal cell loss. *Am. J. Pathol.* **164**:2163-2174.
24. **Bartolini, M., C. Bertucci, V. Cavrini, and V. Andrisano.** 2003. beta-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem. Pharmacol.* **65**:407-416.

25. **Volpicelli, L. A. and A. I. Levey.** 2004. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog. Brain Res.* **145**:59-66.
26. **Racchi, M., M. Mazzucchelli, E. Porrello, C. Lanni, and S. Govoni.** 2004. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacol. Res.* **50**:441-451.
27. **Dineley, K. T.** 2007. Beta-amyloid peptide--nicotinic acetylcholine receptor interaction: the two faces of health and disease. *Front Biosci.* **12**:5030-5038.
28. **Sonkusare, S. K., C. L. Kaul, and P. Ramarao.** 2005. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders--memantine, a new hope. *Pharmacol. Res.* **51**:1-17.
29. **Citron, M.** 2004. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**:677-685.
30. **Rajendran, L., A. Schneider, G. Schlechtingen, S. Weidlich, J. Ries, T. Braxmeier, P. Schwille, J. B. Schulz, C. Schroeder, M. Simons, G. Jennings, H. J. Knolker, and K. Simons.** 2008. Efficient inhibition of the Alzheimer's disease beta-secretase by membrane targeting. *Science* **320**:520-523.
31. **Rodriguez-Cuenca, S., H. M. Cocheme, A. Logan, I. Abakumova, T. A. Prime, C. Rose, A. Vidal-Puig, A. C. Smith, D. C. Rubinsztein, I. M. Fearnley, B. A. Jones, S. Pope, S. J. Heales, B. Y. Lam, S. G. Neogi, I. McFarlane, A. M. James, R. A. Smith, and M. P. Murphy.** 2010. Consequences of long-term oral administration of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ to wild-type mice. *Free Radic. Biol. Med.* **48**:161-172.
32. **Cavalli, A., M. L. Bolognesi, A. Minarini, M. Rosini, V. Tumiatti, M. Recanatini, and C. Melchiorre.** 2008. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *J. Med. Chem.* **51**:347-372.
33. **Bar-Am, O., O. Weinreb, T. Amit, and M. B. Youdim.** 2009. The novel cholinesterase-monoamine oxidase inhibitor and antioxidant, ladostigil, confers neuroprotection in neuroblastoma cells and aged rats. *J. Mol. Neurosci.* **37**:135-145.
34. **Weinreb, O., O. Bar-Am, T. Amit, N. Drigues, Y. Sagi, and M. B. Youdim.** 2008. The neuroprotective effect of ladostigil against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* **175**:318-326.
35. **Bolognesi, M. L., R. Banzi, M. Bartolini, A. Cavalli, A. Tarozzi, V. Andrisano, A. Minarini, M. Rosini, V. Tumiatti, C. Bergamini, R. Fato, G. Lenaz, P. Hrelia, A. Cattaneo, M. Recanatini, and C. Melchiorre.** 2007. Novel class of quinone-bearing polyamines as multi-target-directed ligands to combat Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **50**:4882-4897.

36. **Pang, Y. P., P. Quiram, and T. Jelacic.** 1996. Highly potent, selective and low cost bis tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **271**:23646-23649.
37. **Carlier, P. R., Y. F. Han, E. S. Chow, C. P. Li, H. Wang, T. X. Lieu, H. S. Wong, and Y. P. Pang.** 1999. Evaluation of short-tether bis-THA AChE inhibitors. A further test of the dual binding site hypothesis. *Bioorg. Med. Chem.* **7**:351-357.
38. **Dvir, H., D. M. Wong, M. Harel, X. Barril, M. Orozco, F. J. Luque, D. Munoz-Torrero, P. Camps, T. L. Rosenberry, I. Silman, and J. L. Sussman.** 2002. 3D structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase complexed with huprine X at 2.1 Å resolution: kinetic and molecular dynamic correlates. *Biochemistry* **41**:2970-2981.
39. **Roman, S., N. M. Vivas, A. Badia, and M. V. Clos.** 2002. Interaction of a new potent anticholinesterasic compound (+/-)huprine X with muscarinic receptors in rat brain. *Neurosci. Lett.* **325**:103-106.
40. **Canudas, A. M., D. Pubill, F. X. Sureda, E. Verdaguer, P. Camps, D. Munoz-Torrero, A. Jimenez, A. Camins, and M. Pallas.** 2003. Neuroprotective effects of (+/-)-huprine Y on in vitro and in vivo models of excitotoxicity damage. *Exp. Neurol.* **180**:123-130.
41. **Camps, P., X. Formosa, D. Munoz-Torrero, J. Petriguet, A. Badia, and M. V. Clos.** 2005. Synthesis and pharmacological evaluation of huprine-tacrine heterodimers: subnanomolar dual binding site acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **48**:1701-1704.
42. **Ellman, G. L., K. D. COURTNEY, V. ANDRES, Jr., and R. M. FEATHER-STONE.** 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**:88-95.
43. **Salmona, M., P. Malesani, L. De Gioia, S. Gorla, M. Bruschi, A. Molinari, V. F. Della, B. Pedrotti, M. A. Marrari, T. Awan, O. Bugiani, G. Forloni, and F. Tagliavini.** 1999. Molecular determinants of the physicochemical properties of a critical prion protein region comprising residues 106-126. *Biochem. J.* **342 (Pt 1)**:207-214.
44. **Ved, H. S., M. L. Koenig, J. R. Dave, and B. P. Doctor.** 1997. Huperzine A, a potential therapeutic agent for dementia, reduces neuronal cell death caused by glutamate. *Neuroreport* **8**:963-968.
45. **Munoz-Torrero, D.** 2008. Acetylcholinesterase inhibitors as disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* **15**:2433-2455.
46. **Greig, N. H., T. Utsuki, Q. Yu, X. Zhu, H. W. Holloway, T. Perry, B. Lee, D. K. Ingram, and D. K. Lahiri.** 2001. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr. Med. Res. Opin.* **17**:159-165.

47. **Ballard, C. G., N. H. Greig, A. L. Guillozet-Bongaarts, A. Enz, and S. Darvesh.** 2005. Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Curr. Alzheimer Res* **2**:307-318.
48. **Inestrosa, N. C., J. P. Sagal, and M. Colombres.** 2005. Acetylcholinesterase interaction with Alzheimer amyloid beta. *Subcell. Biochem.* **38**:299-317.
49. **Takada-Takatori, Y., T. Kume, M. Sugimoto, H. Katsuki, H. Sugimoto, and A. Akaike.** 2006. Acetylcholinesterase inhibitors used in treatment of Alzheimer's disease prevent glutamate neurotoxicity via nicotinic acetylcholine receptors and phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Neuropharmacology* **51**:474-486.
50. **Kimura, M., S. Akasofu, H. Ogura, and K. Sawada.** 2005. Protective effect of donepezil against Abeta(1-40) neurotoxicity in rat septal neurons. *Brain Res.* **1047**:72-84.
51. **Arias, E., S. Gallego-Sandin, M. Villarroya, A. G. Garcia, and M. G. Lopez.** 2005. Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors galantamine, donepezil, and rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of nicotinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **315**:1346-1353.
52. **Meunier, J., J. Ieni, and T. Maurice.** 2006. The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid beta₂₅₋₃₅ peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the sigma₁ receptor. *Br. J. Pharmacol.* **149**:998-1012.
53. **Akaike, A.** 2006. Preclinical evidence of neuroprotection by cholinesterase inhibitors. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **20**:S8-11.
54. **Takada, Y., A. Yonezawa, T. Kume, H. Katsuki, S. Kaneko, H. Sugimoto, and A. Akaike.** 2003. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection by donepezil against glutamate neurotoxicity in rat cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**:772-777.